Estratto dalla "Rivista di patologia nervosa e mentale,,
Anno XI, fasc. 11
Clinica di S. Salvi, Firenze.

La degenerazione primaria delle fibre nervose del midollo spinale nella intossicazione tetanica sperimentale.

Dott. N. Tiberti, Professore di Patologia generale nell' Università di Ferrara.

FIRENZE
Società Tipografica Fiorentina
33 — Via San Gallo — 33
—
1906

La degenerazione primaria delle fibre nervose del midollo spinale nella intossicazione tetanica sperimentale (*).

Dott. N. Tiberti, Professore di Patologia generale nell' Università di Ferrara.

È noto che le fibre nervose del midollo spinale possono andare incontro a processi degenerativi, che hanno caratteri anatomo-patologici ed esiti differenti, a seconda del diverso momento etiologico, al quale detti processi sono dovuti.

Talvolta queste degenerazioni dipendono da una lesione a focolaio del cervello, del ponte, del bulbo, del midollo spinale, lesione che intercetta la comunicazione dei varî fasci di fibre coi rispettivi centri trofici, o altera profondamente questi ultimi.

(*) Queste ricerche, iniziate nell'Istituto di Patologia generale di Firenze, diretto dal professore A. Lustig, furono terminate in quello dell'Università di Ferrara.

In altri casi invece la degenerazione delle fibre nervose è dovuta all' azione diretta su di esse di veleni di varia natura, esogeni ed endogeni. Ciò accade, ad esempio, nell' ergotinismo, nella pellagra, nella tabe dorsale, nel diabete, ecc. In questi casi la degenerazione ha un' origine puramente tossica.

Le degenerazioni che costituiscono quest' ultimo gruppo vengono generalmente conosciute col nome di *degenerazioni primarie*, mentre a quelle dell' altro gruppo si dà il nome di *degenerazioni secondarie*.

Già fin dal 1888 l' Adamckievicz accennò a questa distinzione, ma il merito di avere stabilito con precisione i caratteri differenziali fra questi diversi processi degenerativi spetta al Vassale (1), il quale osservò che nella degenerazione primaria si ha un' atrofia più o meno lenta delle fibre nervose, con graduale scomparsa della guaina mielinica, mentre il cilindrasse persiste per un tempo molto lungo: nella degenerazione secondaria invece, tanto nella guaina mielinica, quanto nel cilindrasse, si verifica un grave processo distruttivo, che conduce rapidamente alla scomparsa delle fibre nervose. Secondo il Vassale, il processo che caratterizza la degenerazione primaria è un disturbo di nutrizione, che induce nelle fibre colpite un' atrofia lenta e progressiva sopratutto della guaina mielinica. Nelle fibre nervose si ha una vera e propria demielinizzazione, giacchè la mielina diminuisce di spessore. Il cilindrasse diventa varicoso. Successivamente la nevroglia prolifera e si giunge con molta lentezza al periodo della sclerosi.

Se la causa tossica cessa di esercitare la sua azione o non agisce più con tanta intensità, si può avere la *restitutio ad integrum* delle fibre nervose, le quali quindi sono suscettibili di riprendere la loro nutrizione e la loro funzionalità normale. A questa categoria di processi degenerativi il Vassale propone di dare il nome di *atrofie sistematiche* o *degenerazioni sistematiche atrofiche*.

Già da tempo la tecnica istologica possiede eccellenti metodi per lo studio delle degenerazioni sistematiche secondarie, nelle due fasi da cui queste sono caratterizzate. Nella prima fase, distinta da processi regressivi delle fibre nervose, fino alla distruzione e alla totale scomparsa di esse, il metodo del Marchi mette benissimo in evidenza le alterazioni della mielina, che si trasforma in una sostanza costituita di goccie più o meno grosse e disposte in fila lungo la fibra. Nella seconda fase, nella quale si ha ipertrofia ed iperplasia *ex vacuo* della nevroglia, che va a sostituire gli elementi nervosi distrutti, col metodo del Weigert-Pal si colorano in nero le più minute fibrille nervose, mentre la nevroglia non resta colorata dall' ematossilina.

È notevole il fatto, ed io vi tornerò sopra in seguito, che mentre questi due metodi sono tanto preziosi nello studio delle degenerazioni secondarie, non danno alcun risultato nella fase iniziale delle degenerazioni primarie, la qual cosa il Vassale crede debba attribuirsi al fatto che nella degenerazione primaria non si verificano le gravi alterazioni della mielina, che hanno luogo nelle degenerazioni secondarie e che, almeno per molto

tempo, non si ha la iperplasia del tessuto interstiziale, che è indice di sclerosi.

Per ciò che riguarda lo studio delle degenerazioni primarie o atrofie sistematiche, noi non possedevamo un metodo che mettesse in evidenza le fibre lese, lasciando scolorate le fibre normali; in altre parole, non esisteva nella tecnica istologica un metodo di colorazione positiva delle fibre nervose nella prima fase della degenerazione primaria.

Lo Schaeffer propose di lasciar indurire i centri nervosi in bicromato di potassa, e di trattarli col metodo del Marchi: così operando, i fasci degenerati appaiono più chiari di quelli normali. Questa colorazione negativa, colla quale lo Schaeffer tentava mettere in evidenza le fibre in preda a degenerazione sistematica atrofica era ben lungi dal rispondere alle esigenze della ricerca e fu infatti giudicata insufficiente dallo stesso autore che la propose.

Il Vassale, più volte menzionato, aveva visto che, tenendo per lungo tempo (3-5 mesi) i pezzi di sistema nervoso in bicromato potassico, le parti affette da degenerazione primaria assumono un colore giallo pallido, mentre le normali si presentano di un colore giallo intenso. Questa diversità nella intensità del colore, che si distingue già ad occhio nudo, sarebbe dovuta a che la mielina subisce modificazioni tali da avere una affinità minore per il bicromato che non per le fibre normali.

Questa differenza non è più rilevabile dopo un soggiorno di 1-2 anni in liquido del Müller.

La necessità di un metodo di colorazione positiva, nel senso da me sopra esposto, che potesse permettere un giudizio esatto sulla quantità delle fibre lese, sulla loro localizzazione e sul loro decorso, era molto sentita nella tecnica istologica ed al Donaggio (2) si deve il merito di aver colmata questa lacuna. Egli osservò che le fibre nervose nella prima fase della degenerazione primaria ed anche secondaria, se fissate con bicromato potassico e colorate con ematossilina e, dopo la colorazione, sottoposte all'azione dei varî sali metallici, fra i quali quelli di stagno, di ferro, di rame, di alluminio, acquistavano la proprietà di resistere, più che le fibre normali, ai processi di decolorazione.

Il Donaggio, dopo numerose prove fatte allo scopo di stabilire le condizioni più opportune per le quali fosse spinta al massimo grado la disuguaglianza tra la capacità di resistenza delle fibre normali e quella delle fibre degenerate di fronte alla decolorazione, ha tratto alcune modalità che, pur conducendo allo stesso scopo, presentano nei risultati differenze degne di nota.

Dirò fra poco di questo metodo e specialmente della modalità di cui mi sono servito nelle presenti ricerche.

Ho detto più sopra che la degenerazione primaria delle fibre nervose è dovuta all'azione di influenze dirette di agenti infettivi o tossici che disturbano le condizioni normali di nutrizione e di ricambio materiale delle fibre

nervose. Questi fatti morfologicamente si traducono nella perdita della sostanza cromatica della guaina mielinica e nell' aspetto varicoso del cilindrasse. Le influenze morbigene in questione possono agire più o meno limitatamente o anche in maniera diffusa sulle fibre nervose, e possono anche variare notevolmente di intensità.

Se noi immaginiamo che un veleno, di qualunque natura esso sia, circoli nel sangue, possiamo facilmente spiegarci come esso agisca contemporaneamente sulle fibre nervose e sulle loro cellule centrali di origine: se queste cellule resistono poco e si alterano profondamente ne deriva una alterazione degenerativa secondaria delle fibre nervose; in caso contrario le fibre nervose possono presentare una semplice degenerazione primaria.

Quando una causa dannosa agisce localmente sulle fibre nervose, ma questa azione non è molto intensa, nè duratura, anche l'alterazione delle fibre nervose sarà limitata; se invece detta causa agisce più a lungo e più intensamente, al processo degenerativo primario può accompagnarsi un processo secondario.

Lasciando da parte la degenerazione primaria dei nervi periferici e prendendo in considerazione quella delle fibre del sistema nervoso centrale e specialmente del midollo spinale, ricorderò che essa, oltre a verificarsi nella pellagra, nell'alcoolismo, nell'uremia cronica, nella cachessia cancerigna, nel diabete ecc., è stata osservata in molti intossicamenti provocati per via sperimentale. Il Gurrieri (3) infatti la riscontrò nell'avvelenamento per fosforo, il Vassale, il Masetti (4) la osservarono in seguito alla tiroidectomia completa nei cani, per azione dei veleni, che si accumulano nel torrente circolatorio, consecutivamente alla soppressione della funzione tiroidea. Dal Vassale e dal Donaggio (5) detta degenerazione fu riscontrata negli animali operati di estirpazione delle ghiandole paratiroidi, dal Donaggio (6), dal Luisada e dal Pacchioni (7) nella intossicazione difterica sperimentale; dal Donaggio (8) nell'avvelenamento per $AgNO_3$; dal Pighini (9) nell'avvelenamento acuto e cronico per i tossici dell' *Aspergillus fumigatus*; dal Ceni (10) per infezioni da piogeni.

Essendomi occupato in altre precedenti ricerche (11) di studiare le vie di trasporto ai centri nervosi della tossina tetanica e le alterazioni che questa induce nella parte cromatica e nel reticolo neurofibrillare delle cellule motrici del midollo spinale, non che le alterazioni delle fibre nervose periferiche, mi parve opportuno, per rendere il mio studio completo sotto ogni punto di vista, di vedere se nelle fibre nervose del midollo spinale degli animali tetanici si verificassero processi di degenerazione primaria.

Come animali di ricerca mi servii di quattro conigli e di quattro cavie. La tossina tetanica mi venne gentilmente favorita dall'Istituto Siero-terapico milanese, diretto dal prof. Belfanti. La quantità di tossina adoperata fu $^1/_{100}$ di cc. per le cavie del peso medio di 350 gr. e di $^1/_{80}$ di cc. per i conigli di kg. 1.800. Le cavie morirono tutte entro lo spazio di 3-4 giorni. Dei conigli tre sopravvissero 5 giorni, uno ne sopravvisse sette. Tutti gli

animali presentarono fenomeni evidentissimi di tetano, dopo il solito periodo d' incubazione.

Di tutti gli animali esaminai la sezione cervicale, dorsale e lombare del midollo spinale. Ebbi cura di prendere il sistema nervoso subito dopo la morte dell'animale: qualche animale fu ucciso quando presentava fenomeni tetanici gravissimi.

Il metodo di cui mi servii per mettere in evidenza le fibre degenerate fu quello del Donaggio, e siccome lo scopo precipuo delle mie ricerche era quello di localizzare le fibre lese mi valsi della seconda modalità.

I pezzi di midollo venivano fissati in liquido del Müller, nel quale soggiornarono quattro mesi.

Erano quindi passati in alcool ed inclusi in celloidina. Le sezioni veniAano colorate nella soluzione acquosa di ematossilina all' 1 °/₀ per 15.

Passavo quindi le sezioni direttamente nella soluzione acquosa satura di acetato di rame, tenendovele circa mezz' ora: tenutele quindi per alcuni secondi nella soluzione di permanganato potassico al 0,25 °/₀, le passavo in una miscela a parti uguali di soluzione acquosa di acido ossalico all' 1 °/₀ e di solfito di soda all' 1 °/₀: riportavo di nuovo nella soluzione di permanganato e ripetevo questi passaggi fino a che non ottenevo una completa decolorazione. Indi lavaggio rapido in acqua distillata, disidratazione in alcool e chiusura in balsamo.

Le sezioni di midollo spinale, allestite con questo metodo, appariscono fortemente decolorate. Si distinguono nettamente la sostanza bianca e la sostanza grigia. La sostanza bianca è tempestata da piccoli punti scuri, aventi dimensioni presso a poco uguali. Questi punti scuri sono più numerosi in corrispondenza dei cordoni posteriori e specialmente del fascio di Goll. Si vedono inoltre le fibre della sostanza grigia ben colorate in violetto. Le cellule nervose non vengono con questo metodo messe in evidenza.

A forte ingrandimento (Korist Oc. III, Obb. $^1/_{12}$, Imm. omog.) le fibre nervose della sostanza bianca sezionate trasversalmente appariscono come anelli colorati in giallo molto pallido: qua e là si osservano dei cerchiettini, colorati in bleu scuro e che si riconoscono benissimo per guaine mieliniche che non hanno perduto il colore.

Quelli che a piccolo ingrandimento ci apparivano come punti scuri, si rivelano ora per piccole zolle di forma rotonda, ovalare, quadrangolare ad angoli smussi, aventi tonalità di colori svariati dal rosso mattone, al bleu chiaro, al bleu scuro.

Anche le dimensioni di queste zollette che a piccolo ingrandimento ci apparivano uniformi, a forte ci si mostrano variabili.

Questi blocchetti di diversa grandezza e più o meno intensamente colorati, spiccano molto bene fra le fibre nervose pallide circostanti.

Le zolle tinte in scuro più o meno intenso ottenute col metodo di Donaggio, stanno a rappresentare, giusta la interpretazione che ne dà l' A.,

fibre nervose in preda a degenerazione primaria. E a me le fa ritener tali il fatto del non aver ottenuto alcun risultato su sezioni degli stessi pezzi di midollo spinale, nè col metodo del Marchi, nè con quello del Weigert-Pal. Nella sostanza grigia non si riscontrano fibre sicuramente degenerate.

Mi è stato possibile istituire un raffronto fra i miei preparati ed un preparato di midollo spinale di cane sottoposto ad intossicazione difterica, preparato gentilmente favoritomi dal prof. Donaggio. Da questo raffronto risulta che il numero delle zollettine nere è di gran lunga inferiore a quello che si può osservare nel preparato del Donaggio. Da ciò si deve dedurre che il numero delle fibre nervose lese nel midollo spinale degli animali tetanici è minore di quello che non sia negli animali inoculati colla tossina del bacillo di Löffler. E questo del resto si spiega agevolmente pensando che questi ultimi animali morivano entro il termine di un mese, mentre, come ho già detto, gli animali inoculati con tossina tetanica non sopravvivevano che pochissimi giorni. È un fatto molto naturale che un veleno, qualunque esso sia, agendo per un periodo di tempo più lungo sul sistema nervoso centrale, leda un numero maggiore di fibre, che non un veleno il quale determina sollecitamente la morte dell'animale.

Debbo inoltre far notare che l'osservare le fibre degenerate sparse qua e là nelle sezioni di midollo-spinale, quantunque, come ho detto, se ne osservino in maggior numero nei cordoni posteriori, ci fa pensare che nell'intossicazione tetanica sperimentale si tratti più che di una degenerazione primaria propria di speciali fasci di fibre, di una degenerazione primaria diffusa di esse. Del che ci possiamo render ragione pensando come la tossina tetanica colpisca il sistema nervoso nella sua totalità.

Si potrebbe obbiettare che le fibre nervose lese, da me riscontrate nel midollo spinale degli animali tetanici, fossero in preda, non già a degenerazione primaria, ma a degenerazione secondaria, tanto più che dalle mie precedenti ricerche risulta che la tossina tetanica esercita un'azione nociva sulle cellule nervose. Ma i resultati negativi ottenuti col metodo del Marchi e con quello del Weigert-Pal, dei quali ho già parlato, fanno escludere questa ipotesi. E mi sembra anche che possa logicamente escludersi che la tossina tetanica, agendo sulla fibra nervosa possa determinare la discontinuità del cilindrasse e che da ciò dipenda la degenerazione della fibra, degenerazione che in questo caso sarebbe secondaria. Ma si pensi che prima che ciò possa accadere, data la resistenza del cilindrasse, l'animale è morto per le gravi lesioni dei centri nervosi.

Il fatto della rapidità con cui si manifesta la degenerazione primaria nelle fibre nervose del midollo spinale degli animali tetanici sta a confermare quanto è stato da altri osservato nel midollo spinale dei cani, in seguito alla estirpazione delle paratiroidi e nell'avvelenamento per fosforo.

Non voglio terminare queste brevi considerazioni, senza dire due parole dei vantaggi che offre il metodo del Donaggio, da me adoperato. Con esso

mi è stato possibile anzitutto mettere in evidenza nelle fibre nervose del midollo spinale degli animali tetanici una lesione che sarebbe sfuggita col metodo del Marchi e con quello del Weigert-Pal.

Si noti inoltre che essendo le fibre nervose degenerate, nei casi da me studiati, non raccolte in veri fasci, ma essendo sparse qua e là nel midollo spinale, esse sarebbero indubbiamente passate inosservate, adoperando un metodo di colorazione non positiva.

A questo si aggiunga la costanza della riuscita, l' essere il metodo applicabile anche a materiale non fresco, il fatto di colorare esclusivamente le fibre lese, isolando queste ultime dal restante tessuto sano e di mettere in evidenza la degenerazione primaria nella sua fase iniziale. Tutto questo rende il metodo del Donaggio molto prezioso, lasciando concepire le più fondate speranze nel campo della patologia umana, al quale è stato già applicato con successo dallo stesso autore, che con esso ha studiato i centri nervosi appartenenti ad ammalati di forme mentali acute.

Ed ora, concludendo, possiamo dire che la tossina tetanica è capace di indurre una degenerazione primaria nelle fibre nervose del midollo spinale degli animali con essa inoculati, degenerazione la quale, più che essere sistematizzata, si verifica in maniera diffusa.

Per quanto nei casi da me studiati il numero delle fibre lese non sia molto cospicuo, pure il fatto constatato ha un interesse notevole, in quanto che rappresenta una prova sperimentale di più di degenerazione primaria delle fibre nervose del midollo spinale, dovuta a veleni batterici.

Bibliografia.

1. Vassale, Sulla differenza anatomo-patologica fra degenerazioni sistematiche primarie e secondarie del midollo spinale. (Rivista sperimentale di Freniatria, Vol. 22, 1896).
2. Donaggio, Colorazione positiva delle fibre nervose nella fase iniziale della degenerazione primaria e secondaria, sistematica o diffusa del sistema nervoso centrale. (Rivista sperimentale di Freniatria, vol. XXX, 1904).
3. Gurrieri, Degenerazioni sistematizzate del midollo spinale nell' avvelenamento sperimentale per fosforo. (Ibidem, 1896).
4. Masetti, Le alterazioni del midollo spinale nei cani tiroidectomizzati. (Ibidem, 1896).
5. Vassale e Donaggio, Le alterazioni del midollo spinale nei cani operati d'estirpazione delle ghiandole paratiroidee. (Ibidem, 1906).
6. Donaggio, Le alterazioni dei centri nervosi nella intossicazione difterica sperimentale. (Rivista di patologia nervosa e mentale, vol. III, 1898).
7. Luisada e Pacchioni, Azione della tossina difterica sul sistema nervoso. (Il Policlinico, 1898).
8. Donaggio, Lesioni degli elementi nervosi nell'avvelenamento sperimentale per nitrato d' argento. (Rivista sperimentale di Freniatria, vol. XXIV, 1898).
9. Pighini, Degenerazioni primarie da tossici aspergillari. (Ibidem, vol. XXIX, 1903).
10. Ceni, Rivista sperimentale di Freniatria, vol. XXIV, 1898.
11. Tiberti, Ueber den Transport des Tetanusgiftes zu den Rückenmarkszentren dürch die Nervenfasern. (Centrabl. f. Bakteriologie, vol. XXXVIII, 1905); Il reticolo neurofibrillare delle cellule motrici del midollo spinale negli animali tetanici. (Rivista di patologia nervosa e mentale, 1905).

Veggasi inoltre:

Lugaro, Allgemeine pathologische Anatomie der Nervenfasern. (Handbuch der pathologischen Anatomie des Nervensystems. Berlin, 1904).